

Związki naturalne w modulacji oporności wielolekowej

Alicja Fryc, Jagoda Dąbrowska

Studenckie Koło Naukowe "Biologia komórki nowotworowej"

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej

Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

e-mail: ala.fryc@gmail.com

Praca napisana pod opieką mgr Olgi Michel.

Oporność wielolekowa, wcześniej występująca głównie w leczeniu zakażeń bakteryjnych i grzybiczych, coraz częściej stanowi poważny problemem także w terapii przeciwnowotworowej. Dużą rolę odgrywają białka z rodziny ABC (ang. ATP-binding cassette) - transportery błonowe, które w warunkach zdrowia odpowiedzialne są za usuwanie związków z komórek na drodze transportu aktywnego. Przykładem takiego białka jest P-glikoproteina (P-gp). W komórkach nowotworowych dochodzi do pierwotnej lub wtórnej nadekspresji danych białek. Leki chemioterapeutyczne takie jak: cisplatyna, doksorubicyna, paklitaksel są substratami P-gp, co skutkuje trudnością w osiągnięciu stężenia terapeutycznego leku w komórce. W celu przełamania zjawiska wielolekooporności poszukiwane są inhibitory P-gp, zwłaszcza takie, które cechują się wysoką swoistością substratową oraz nie wykazują właściwości toksycznych w stosowanych stężeniach. Do tej grupy można zaliczyć związki pochodzenia naturalnego, takie jak: kurkumina, honokiol i katechina. Dodatkowo wpływają one na zmniejszenie ekspresji P-gp. Te właściwości pozwalają na użycie chemioterapii skojarzonej z inhibitorami P-gp w przypadku nowotworów wielolekoopornych. Praca stanowi przegląd literaturowy w celu sprawdzenia obecnego stanu wiedzy na temat możliwości wykorzystania kurkuminy, katechiny i honokiolu w inhibicji glikoproteiny P.

Wstęp

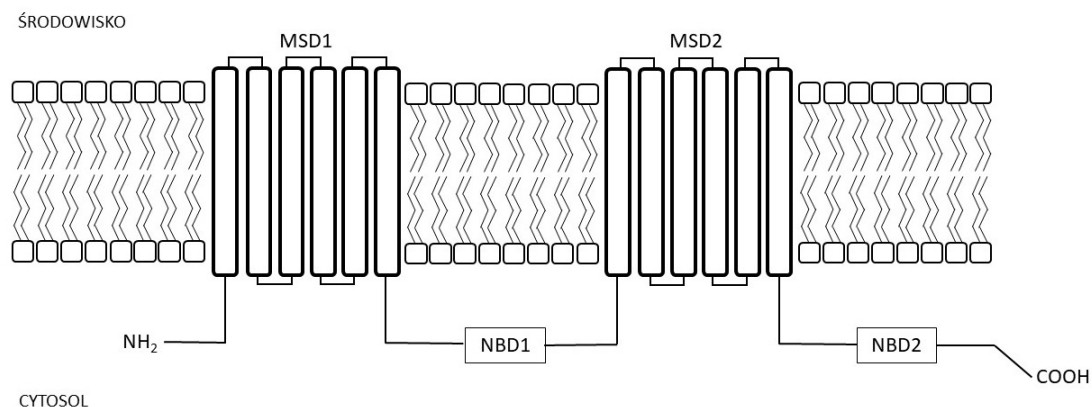
Jedną z głównych metod leczenia nowotworów, w obecnych czasach, jest chemioterapia. Niektóre nowotwory, takie jak rak jajnika, piersi, okrężnicy często wykazują oporność wielolekową (ang. *multidrug resistance*, MDR), co prowadzi do niepowodzeń terapeutycznych. Do zrozumienia tego procesu przyczyniło się odkrycie

glikoproteiny P (P-gp) oraz innych białek z rodziny ABC, które są odpowiedzialne za zjawisko wypompowywania leków z komórki nowotworowej. Zaczęto poszukiwania leków, które powodowałyby inhibicję glikoproteiny P. Swoje zastosowanie znalazły tu kurkumina, katechina i honokiol [2, 10].

Białka w oporności wielolekowej: Charakterystyka transporterów z rodziny ABC

Znaczącą rolę w oporności wielolekowej odgrywają transportery wiążące ATP – białka z rodziny ABC (ang. *ATP-binding cassette*). Białka z tej rodziny dzielą się na trzy formy funkcjonalne: importery występujące w komórkach prokariotycznych, eksportery zarówno w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych oraz białka biorące udział w translacji i naprawie genów. Za zjawisko MDR odpowiedzialne są białka transporterowe o funkcji eksporterów. W warunkach zdrowia są one odpowiedzialne za usuwanie z komórek endo- lub egzogennych substancji toksycznych. Obecne są w narządach takich jak: nerki, jelito, wątroba oraz śródbłonek naczyń tworzących barierę krew-mózg i barierę łożyskową. Lokalizacja ta jest o tyle istotna, że są to tkanki mające bezpośredni kontakt z substancjami toksycznymi i lekami albo chroniące mózg lub rozwijający się w macicy płód. Przykładem takiego białka jest glikoproteina P (Ryc. 1).

Jest to białko błonowe zbudowane z cytozolowego regionu NBD (ang. *nucleotide binding domain*) wiążącego i rozkładającego ATP oraz dwóch podjednostek, każda złożona jest z transbłonowej domeny MSD (ang. *membrane spanning domain*), zawierającej rejonu wiążące substrat - DBS (ang. *drug binding sites*). Proponuje się obecnie trzy mechanizmy aktywnego transportu substancji sprzęgniętego z hydrolizą ATP: (1) klasyczna pompa (związek oddziałuje z rejonem wiążącym i przenoszony jest przez kanał do środowiska wodnego na zewnątrz komórki), (2) flipaza (związek rozpuszczony w wewnętrznej warstwie fosfolipidów przenoszony jest do warstwy zewnętrznej, skąd może dyfundować do środowiska) i (3) „odkurzacz molekularny” (związek rozpuszczony w fosfolipidach błony komórkowej przenoszony jest do wnętrza kanału białka i transportowany na zewnątrz komórki). Substratami P-gp mogą być substancje o charakterze hydrofobowym lub amfifilowym, napływające do komórki poprzez dyfuzję bierną. W praktyce medycznej będą to



Ryc. 1. Budowa glikoproteiny P [10]

między innymi: leki chemioterapeutyczne takie jak: cisplatyna, dokсорубина, paklitaksel, ale również szereg antybiotyków (erytromcyna, lewofloksacyna, tetracykliny), leki immunosupresyjne, hipotensyjne i przeciw-wirusowe. W komórkach nowotworowych dochodzi do pierwotnej lub wtórnej nadekspresji tych białek, co skutkuje nadmiernym usuwaniem chemioterapeutyku z komórki. Uniemożliwia to koncentrację leku wewnątrz komórki, który w efekcie nie wywiera działania terapeutycznego [1, 2, 10, 13].

Modulacja MDR

W związku z poważnymi implikacjami klinicznymi wynikającymi ze zjawiska MDR w terapii przeciwnowotworowej, przedmiotem wielu badań stały się poszukiwania leków znoszących wielolekooporność lub działających pomimo jej wystąpienia. W walce ze zjawiskiem MDR związanym z działaniem P-gp można stosować leki niebędące jej substratami, podawać lek zamknięty w nanocząsteczkach lub blokować działanie transporterów błonowych. Można tego dokonać poprzez hamowanie transkrypcji genu (blokowanie promotora, wiązanie czynników transkrypcyjnych), zahamowanie translacji (poprzez oligodeoksyrybonukleotydy, czy wyciszanie genów przez siRNA) lub zastosowanie inhibitorów gliko-proteiny P. Inhibitorami są zazwyczaj związki wysoko hydrofobowe, małowcząsteczkowe z pierścieniem aromatycznym w cząsteczce. Stosowane inhibitory I generacji (m.in. werapa-

mil, chinina, cyklosporyna A), hamujące kompetycyjnie P-gp, charakteryzowały się małym powinowactwem do białek MDR, co wymuszało podawanie dużej dawki leków, przez co wykazywały one bardzo często poważne działania niepożądane. Leki II generacji (np. PSC-833) wciąż były mało swoiste i dodatkowo hamowały kompetycyjnie cytochrom P450, co istotnie zmieniało farmakokinetykę podawanych leków oraz powodowało interakcje z innymi lekami. Inhibitory III generacji (laniquidar, zosuquidar, elacridar) wykazują wysoką swoistość w wiązaniu glikoproteiny P wiążąc się z nią niekompetycyjnie. Hamują one także inne transportery z rodziny ABC, MRP1 oraz ABCG2, co także stwarza pewne implikacje kliniczne. Obecnie stosowane leki wykazują dużo mniejszą toksyczność oraz wyższą swoistość, jednak wciąż poszukiwane są inhibitory kolejnych generacji znoszące skutki zjawiska MDR niewykazujące poważnych działań niepożądanych. Do IV generacji leków, o znacznie lepszych właściwościach, zalicza się między innymi substancje pochodzenia naturalnego - kurkuminę, katechinę i honokiol [2].

Związki naturalne i ich wykorzystanie w modulacji MDR

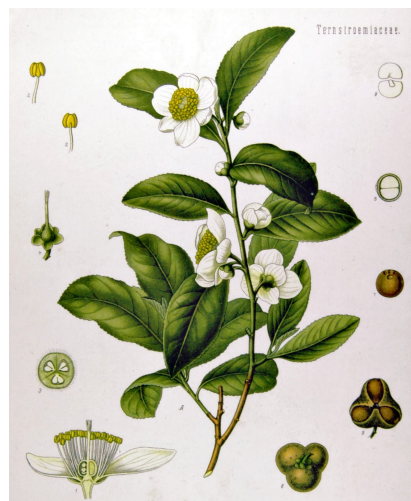
Kurkumina jest związkiem pozyskiwanym z rośliny *Curcuma longa* (Ryc. 2), szeroko rozpowszechnionej w kuchni, kosmetyce i medycynie Indyjskiej. Proszek o charakterystycznej żółtej barwie jest otrzymywany z kłącza rośliny. Od wielu lat znane są przeciwzapalne,



Ryc. 2. *Curcuma longa* [14].

antyoksydacyjne oraz antymutagenne właściwości kurkumy. Wykazano także, że obniża ona poziom glukozy i cholesterolu we krwi, ma również działanie hepatoprotekcyjne. Prowadzone są badania nad przeciwnowotworowymi właściwościami kurkuminy, z których wynika, że działa ona w wielu szlakach metabolicznych i ma wpływ zarówno na komórki nowotworowe, jak i ich otoczenie. Prawdopodobnie przeciwnowotworowe działanie kurkuminy polega na inhibicji oraz zmniejszeniu ekspresji glikoproteiny P.

Katechina to flawonol pozyskiwany z liści *Camellia sinensis* L. (Ryc. 3). W roślinie tej, niepoddanej procesowi technologicznemu produkcji czarnej herbaty, występuje wysokie stężenie szeregu związków takich jak: galusan epigallokatechiny, galusan epikatechiny, epikatechina. Mają one właściwości antyoksydacyjne (zwiększanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, inhibicja prooksydacyjnych), antykan-



Ryc. 3. *Camellia sinensis* L. [15].

cerogenne (inicjacja apoptozy komórek nowotworowych, hamowanie proliferacji, zmniejszenie zdolności inwazji i przerzutowania), przeciwmiażdżycowe, ochronne dla serca w czasie chemioterapii. Niektóre katechiny wykazują także działanie podobne do kurkuminy, hamują aktywność P-gp oraz ekspresję tego białka.

Honokiol pozyskiwany jest z kory *Magnolia officinalis* (Ryc. 4). Ekstrakt z magnolii od lat znany jest w tradycyjnej medycynie chińskiej i stosowany do leczenia niepokoju, zaburzeń snu i trawienia oraz alergii. Wykazano również, że ma działanie przeciwzakrzepowe, przeciwzapalne, antyoksydacyjne. Oddziałuje na komórki nowotworowe nie tylko przez inhibicję glikoproteiny P, ale także przez regulację stresu oksydacyjnego, metabolizmu glukozy i glutaminy oraz indukcję apoptozy [3, 4, 5, 6, 8, 11].

Liczne ośrodki prowadzą obecnie badania na liniach komórkowych oraz zwierzętach laboratoryjnych, mające

na celu wykazanie wpływu kurkuminy, honokiolu i katechiny na wielolekooporne komórki nowotworowe. Wyniki tych eksperymentów dają nadzieję na wprowadzenie tych substancji do leczenia. Najwięcej badań prowadzonych jest nad wpływem kurkuminy na P-gp. Wykazano, że pod wpływem kurkuminy następuje inhibicja wzrostu komórek nowotworowych, która jest zależna od stężenia kurkuminy oraz czasu inkubacji. Jest ona znacznie większa niż przy próbach kontrolnych z zastosowaniem typowych chemioterapeutyków, np. winkrystyny, lecz najlepsze efekty wykazuje w połączeniu z tym lekiem. W badaniach prowadzonych na myszach laboratoryjnych wykazano znaczący spadek objętości guza po zastosowaniu kurkuminy, a także kurkuminy z winkrystyną, w porównaniu do prób kontrolnych. W przyszłości planowane są badania kliniczne z wykorzystaniem kurkuminy w leczeniu m.in. nowotworu trzustki. Równie dobre efekty osiągnano przy zastosowaniu katechiny oraz honokiolu.



Ryc. 4. *Magnolia officinalis* [16].

Preinkubacja komórek nowotworowych w roztworze honokiolu powoduje znaczny spadek ekspresji glikoproteiny P, a tym samym umożliwia osiągnięcie wymaganego stężenia leku stosowanego w chemioterapii. Dodatkowo honokiol wpływa na apoptozę komórek nowotworowych. Wykazano, że katechina, tak jak kurkumina, wpływa zarówno na ekspresję glikoproteiny P, jak i wywołuje inhibicję tego transportera [1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12].

Biodostępność

Problemem z wykorzystaniem powyższych związków jest ich niska biodostępność, hydrofobowy charakter, szybki metabolizm w przewodzie pokarmowym oraz znaczny efekt pierwszego przejścia. W celu przezwyciężenia tych trudności prowadzone są prace nad wykorzystaniem nanocząsteczek. Lek zamknięty jest w liposomach, micelach lub opłaszczany albuminami. Powoduje to znaczne zwiększenie jego stężenia w płynach ustrojowych i umożliwia dotarcie do guza, a także zmniejsza efekty uboczne. W badaniach in vitro i in vivo odniesiono sukces poprzez zamykanie kurkuminy i katechiny w nanocząsteczkach. Najlepszym działaniem przeciwnowotworowym charakteryzuje się połączenie inhibitora glikoproteiny P z typowym chemioterapeutykiem, dlatego utworzono nanocząsteczki zawierające w swoim rdzeniu m.in. katechinę i doksorubicynę. Pozytywne wyniki badań dają nadzieję na zastosowanie nanotechnologii oraz związków pochodzenia naturalnego w praktyce klinicznej [1, 4, 10].

Wnioski

Opisane substancje pochodzenia naturalnego: kurkumina, katechina i honokiol dzięki swoim właściwościom dają ogromne nadzieje na opanowanie implikacji wynikających ze zjawiska wielolekooporności nowotworów. Ważną zaletą jest ich niska toksyczność - nie powodują poważnych skutków ubocznych. Dodatkowe zastosowanie nanotechnologii może pozwolić na wejście w nową erę walki z nowotworem.

Bibliografia:

- [1] Baghbani F., Bypassing multidrug resistant ovarian cancer using ultrasound responsive doxorubicin/curcumin co-deliver alginate nanodroplets, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 1(153), 132-140.
- [2] Bamburowicz-Klimkowska M., Strategie walki ze zjawiskiem oporności wielolekowej nowotworów, *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 2012, 1, 1-8.
- [3] Bogacz A., The effect of herbal materials on the P-glycoprotein activity and function, *Herba Polonica*, 2013, 59(4), 129-141.
- [4] Cheng T., Green Tea Catechin-Based Complex Micelles Combined with Doxorubicin to Overcome Cardiotoxicity and Multidrug Resistance, *Theranostics*, 2016 6;6(9), 1277-12-92.
- [5] Donejko M., Właściwości antynowotworowe galusanu epigallokatechiny zawartego w zielonej herbacie, *Postępy Hig Med Dosw (online)*, 2013, 67, 26-34
- [6] Kania M., Wybrane właściwości biologiczne i farmakologiczne zielonej herbaty (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), *Borgis - Postępy Fitoterapii* 2011, 1, 34-40.
- [7] Klimowicz A., Wpływ wybranych roślin leczniczych na aktywność glikoproteiny P, *Borgis - Postępy Fitoterapii* 2011, 3, 169-174.
- [8] Li C., Compounds from Chinese herbal medicines as reversal agents for P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumours, *Clinical & Translational Oncology*. 2014, 16(7), 593-598.
- [9] Lopes-Rodrigues V., Curcumin as a Modulator of P-Glycoprotein in Cancer: Challenges and Perspectives, *Pharmaceuticals* 2016, 9(4), 71.
- [10] Popęda M., Białka w oporności wieloleko-

wej nowotworów, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2014, 68, 616-632.

- [11] Rempel V., Magnolia Extract, Magnolol, and Metabolites: Activation of Cannabinoid CB2 Receptors and Blockade of the Related GPR55. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2013 4(1), 41-45.

[12] Terlikowska K., Kurkumina w chemopreencji raka piersi. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2014, 68, 571-578.

- [13] Wawrzycka D., ABC transportery *Saccharomyces cerevisiae*, *Postępy biochemii*, 2011, 57(3), 324-332.

[14] http://raf.dessins.free.fr/2bgal/img.php?id_img=14543 [data dostępu: 08.09.2017 r.]

[15] <https://recordsofthepurelands.wordpress.com/2014/12/08/out-of-the-mist-the-old-tea-horse-road/> [data dostępu: 08.09.2017 r.]

[16] <http://whelan37.blogspot.com/2011/05/assigment-9-magnolia-officinalis.html> [data dostępu: 08.09.2017 r.]